

## اثر عوامل مترشح سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با نیکوتین، بر روی عملکردهای نوتروفیل ها

سمیرا پورطیب، سید میثم ابطحی فروشانی\*

گروه میکروب شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۸

### چکیده:

**زمینه و هدف:** تأثیر سلول های بنیادی مزانشیمال بر عملکرد سلول های نوتروفیل به تازگی مشخص شده است؛ همچنین نشان داده شده است که سلول های بنیادی مزانشیمال قادر به بیان برخی از تحت واحدهای گیرنده های نیکوتینی می باشند. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات نیکوتین بر روی عملکرد فاکتورهای مترشح سلول های بنیادی مزانشیمال بر روی نوتروفیل ها می باشد.

**روش بررسی:** بعد از جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان رت ها، این سلول ها با غلظت های متفاوتی از نیکوتین (۰،۱/۰،۱/۰،۵ میکرو مولار) به مدت ۴۸ ساعت مجاور شدند؛ سپس نوتروفیل های جدا شده با مایع رویی این سلول ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند، آنگاه عملکرد نوتروفیل ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** به نظر می رسد که مایع رویی سلول های بنیادی تیمار شده با نیکوتین به طور معنی داری موجب افزایش زنده مانی و قابلیت فاگوسیتوز سلول های نوتروفیل در سطحی به مراتب بیشتر از مجاورت نوتروفیل ها با مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می گردد. به علاوه مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با نیکوتین به طور معنی داری موجب کاهش انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید توسط نوتروفیل ها نسبت به مایع رویی سلول های بنیادی تیمار نشده شد.

**نتیجه گیری:** در مجموع این یافته ها ممکن است که افق جدیدی را در ارتباط با درک سازوکارهای ضد التهابی و ایمنومولاتوری متناسب به نیکوتین نشان دهد.

**واژه های کلیدی:** سلول بنیادی مزانشیمال، نوتروفیل، نیکوتین.

### مقدمه:

سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs) گروهی از سلول های پیش ساز غیر خون ساز هستند که قابلیت تمایز به انواع سلول های بافت هایی از قبیل استخوان، غضروف، تاندون، بافت چربی و سلول های عضله صاف را دارند (۳). سلول های بنیادی مزانشیمال به دلیل دارا بودن ویژگی های تعدیل کننده ایمنی به صورت بالقوه در جهت تخفیف بیماری های ناشی از پاسخ های التهابی سلول های ایمنی در برخی از بیماری ها از قبیل دیابت نوع ۱، آرتریت روماتوئید و اسکروز متعدد مورد توجه قرار گرفته اند (۴). ارتباط بین سلول های بنیادی

نوتروفیل ها ۷۰-۵۰٪ جمعیت گویچه های سفید خون را تشکیل می دهند. این سلول ها نقش اصلی را در حذف عوامل بیماری زا و ایجاد مرحله حاد التهاب را بازی می کنند. اهمیت نوتروفیل در نقایص شدید ایمنی حاصل از شیمی درمانی یا واکنش به داروهای سایتوتوکسیک به خوبی مشخص شده است (۱). این سلول ها سطح بالایی از پروتئازها و رادیکال های آزاد اکسیژن را تولید می کنند که نقش مهمی را در دفاع و آسیب به سلول های میزبان در حین فرآیندهای التهابی بازی می کنند (۲).

\*نویسنده مسئول: ارومیه- دانشگاه ارومیه گروه میکروب شناسی- تلفن: ۰۹۱۳۳۰۰۰۴۷۰، E-mail: meysamabtahi@hotmail.com

مزانشیمال با سایر سلول ها از قبیل سلول های نوتروفیل به خوبی مشخص شده است (۵-۷). به طور مثال نشان داده شده است که سلول های مزانشیمال موجب حفاظت نوتروفیل ها از مرگ ناشی از محرومیت از سرم می شود (۶).

واسطه های کولینرژیک به عنوان مولکول های انتقال دهنده پیام در طیف بسیار گسترده ای از موجودات زنده از قبیل باکتری ها، گیاهان و حشرات و پستانداران عمل می کند (۹،۸). نیکوتین یک آکالوئید قوی مقلد اثرات کولینرژیک بوده که به مقدار فراوان در برگ های تنباکو و همچنین به میزان کمتری در سایر اعضای گیاهان خانواده سولاناسه یافت می شود (۱۰). نیکوتین همچنین در برخی از آفت کش ها نیز حضور دارد (۱۱). نیکوتین از جمله مهم ترین عوامل موجود در دود سیگار که منجر به وابستگی در افراد سیگاری می شود، می باشد. هر نخ سیگار حاوی ۱۰ تا ۱۴ میلی گرم نیکوتین می باشد. یک فرد سیگاری پس از استعمال هر نخ سیگار به طور متوسط ۱ میلی گرم نیکوتین دریافت می دارد (۱۲). به طور جالب توجهی نشان داده شده است که گیرنده های پاسخگو به نیکوتین بر روی سلول های مختلفی از قبیل سلول های عصبی، سلول های بنیادی مزانشیمال و سلول های ایمنی حضور دارند (۹،۸).

با این حال تاکنون اطلاعات قابل توجهی در مورد نقش نیکوتین در شکل دهی به ارتباط سلول های مزانشیمال و سلول های نوتروفیل در دسترس نمی باشد. با توجه به مطالب فوق و نظر به گسترش روز افزون خطر نیکوتین (ورود حشره کش های نیکوتینی به چرخه غذایی و یا اعتیاد به سیگار)، در پژوهش حاضر اقدام به ارزیابی عملکرد سلول های بنیادی مزانشیمال پس از مواجهه با نیکوتین بر قابلیت های سلول های نوتروفیل پرداخته خواهد شد.

## روش بررسی:

سلول های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان های تیبا و فمور رت های نژاد ویستار مطابق روش

Zappia و همکاران جداسازی شد (۱۱). رت های مزبور از حیوانخانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. تمامی مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفت. بدین منظور پس از آسان کشی رت ها، با استفاده از قیچی و اسکالپل، استخوان های ران و ساق پا از استخوان لگن رت ها جدا شده و با استفاده از تامپون استریل پوست و ماهیچه اضافی از استخوان ها جدا و سپس آن ها داخل پتری دیش حاوی محیط کشت استریل قرار داده شد؛ سپس اقدام به فلاشینگ مغز استخوان های مزبور به کمک محیط کشت DMEM ساخت (Gibco- انگلستان) شد. سلول های حاصله پس از ۲ بار شستشو، با غلظت  $4 \times 10^5$  سلول به ازای هر سانتی متر مربع به فلاسک های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰٪ FBS ساخت (Gibco- انگلستان) منتقل شدند. سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و حضور ۵٪ دی اکسید کربن در گرمخانه گرماگذاری شدند؛ سپس سلول های غیر چسبنده حذف و کشت سلول های چسبنده ادامه یافت. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یک بار انجام گرفت و پس از اولین تراکم بیش از ۷۰٪، سلول های چسبنده با استفاده از تریپسین (Sigma- آمریکا) حاوی ۲٪ EDTA از کف فلاسک جداسازی و جهت پاساژ به فلاسک های بعدی منتقل شدند. در نهایت، از پاساژ سوم سلول ها جهت انجام آزمایش های مجاورسازی با نوتروفیل ها استفاده گردید (۱۱).

پس از پاساژ سوم، سلول های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان با غلظت های متفاوتی از نیکوتین (۵، ۱۰، ۱۰۰، ۱ میکرومولار) به مدت ۴۸ ساعت مجاور شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، مایع رویی سلول ها جمع آوری شده و به دور ریخته شد. پس از شست و شوی سلول ها، به منظور حذف بقایای نیکوتین، به سلول ها محیط کشت تازه افزوده شده و به مدت ۲۴ ساعت دیگر انکوبه شدند. در نهایت، این

مایع رویی جمع آوری شده و پس از فیلتر کردن با فیلتر ۰/۲ میکرون به عنوان مترشحه سلول های بنیادی استفاده شد.

سلول های نوتروفیل از خون محیطی رت ها به کمک مگلو مین کامپاند ساخت شرکت (داروپخش- تهران) جداسازی شد (۱۲). تعداد  $2 \times 10^6$  سلول نوتروفیل در حجم ۲۰۰۰ میکرولیتر به همراه ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی در داخل پلیت های ۶ خانه ریخته شد؛ سپس به مدت ۴ ساعت، تحت شرایط ۳۷ درجه با ۵٪  $CO_2$  و رطوبت ۸۰٪ انکوبه گردیدند. بعد از گذشت زمان انکوبه شدن سلول های نوتروفیل جمع آوری شد و جهت انجام تست های تکمیلی زیر استفاده شد.

در ابتدا قابلیت بیگانه خواری سلول های نوتروفیل مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه سوسپانسیون باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با سرم تازه رت های نژاد ویستار اپسونیزه شد و سپس با سلول های نوتروفیل مجاور شده با مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال (به نسبت ۱۰ به ۱) در یک میلی لیتر محیط کشت RPMI به مدت ۰/۵ ساعت انکوبه گردید. پس از فیکس کردن سلول ها با فرمالین ۱۰٪ و رنگ آمیزی آن ها با هماتوکسیلین-ئوزین، سلول های نوتروفیل رنگ آمیزی شده در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی  $100 \times$  بررسی شدند. تعداد ۵ شان به ازای هر لام مورد مطالعه قرار گرفت (۱۳). هر شان حدوداً حاوی ۷۰-۱۰۰ سلول نوتروفیل بود. بدین ترتیب تعداد کل نوتروفیل هایی که فاگوسیتوز انجام داده بودند، مشخص شد.

به منظور ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اپسونیزه با سرم تازه رت های نژاد ویستار ( $2 \times 10^6$ ) سلول در هر میلی لیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل مجاور شده با مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال ( $2 \times 10^6$  سلول در هر میلی لیتر) به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱٪ NBT به داخل چاهک های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. این سلول ها در پلیت های کشت ۹۶ خانه به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد

و ۵٪ دی اکسیدکربن انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون سلول ها ۳ بار شسته شده و با متانول تثبیت شدند. آنگاه کریستال های فیکس شده فورمازون با افزودن ۱۴۰ میکرولیتر DMSO و ۱۲۰ میکرولیتر KOH ۲ مولار حل شد. پلیت ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا خوان خوانده شدند.

جهت سنجش قابلیت تولید نیتریک اکساید توسط نوتروفیل ها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اپسونیزه با سرم تازه رت های نژاد ویستار ( $2 \times 10^6$  سلول در هر میلی لیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل مجاور شده با مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال ( $2 \times 10^6$  سلول در هر میلی لیتر) به داخل چاهک های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. این سلول ها به مدت ۸۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ دی اکسیدکربن انکوبه شدند. میزان تولید نیتریک اکساید توسط روش رنگ سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت سلول های نوتروفیل به صورت ۲ تایی به داخل چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ته تخت ریخته شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱٪ سولفانیل آمید (شرکت Sigma- آمریکا) به چاهک ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگهداری شد. آنگاه به تمام حفره ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱٪ N-1-I نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید (شرکت Sigma- آمریکا) اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگهداری شد. در نهایت، جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا نگار قرائت گردید. هم زمان با استفاده از غلظت های مختلف نیتریت سدیم منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتریت موجود در نمونه ها تعیین گردید. با توجه به حضور نیتریک اکساید به عنوان جزئی از عوامل مترشحه سلول های بنیادی مزانشیمال در هر تکرار آزمایش میزان نیتریک اکساید مایع رویی سلول های

Microsoft Excel (سال ۲۰۱۳) استفاده گردید. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. سطح معنی داری،  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته ها:

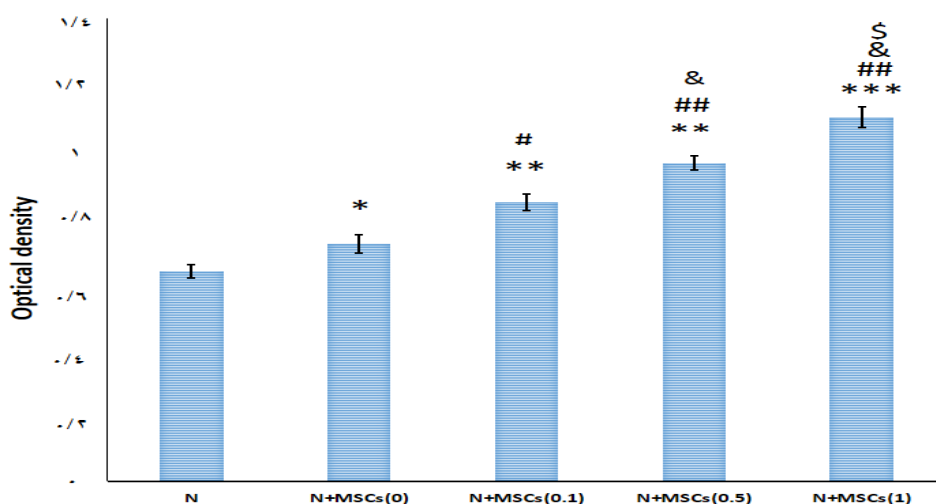
سلول های جدا شده از مغز استخوان پس از کشت دادن در محیط کشت به تدریج کشیده شده و مشابه سلول های فیبروبلاست می گردند. در نهایت، از پاساژ سوم سلول های کشت داده شده به عنوان سلول های بنیادی مزانشیمال استفاده شد (تصویر شماره ۱).

مطابق نمودار شماره ۱ مایع رویی سلول های مزانشیمال قادر به افزایش بقای سلول های نوتروفیل می باشند. در همین راستا مایع رویی حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با نیکوتین در غلظت ۰/۱ میکرومتر و بیشتر موجب تشدید عملکرد سلول های مزانشیمال در افزایش بقای سلول های نوتروفیل به صورت وابسته به دوز می گردد (نمودار شماره ۱).

بنیادی مزانشیمال محاسبه و از میزان نیتریک اکساید محاسبه شده در کشت هم زمان نوتروفیل ها و عوامل مترشح سلول های بنیادی مزانشیمال کسر شد.

به منظور سنجش میزان زنده مانی سلول های نوتروفیل، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل ( $2 \times 10^6$  سلول در هر میلی لیتر)، به همراه ۱۰ میکرولیتر از عوامل مترشح سلول های بنیادی مزانشیمال به داخل پلیت های ۹۶ خانه ریخته شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به چاهک ها افزوده و به مدت ۴ ساعت دیگر در ۳۷ درجه انکوبه می گردید. ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به چاهک ها اضافه و شیک گردید. آنگاه پلیت ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا خوان خوانده شدند.

در نهایت، جهت مقایسه داده ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی استفاده شد. تمامی بررسی های آماری در محیط نرم افزاری SPSS انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار



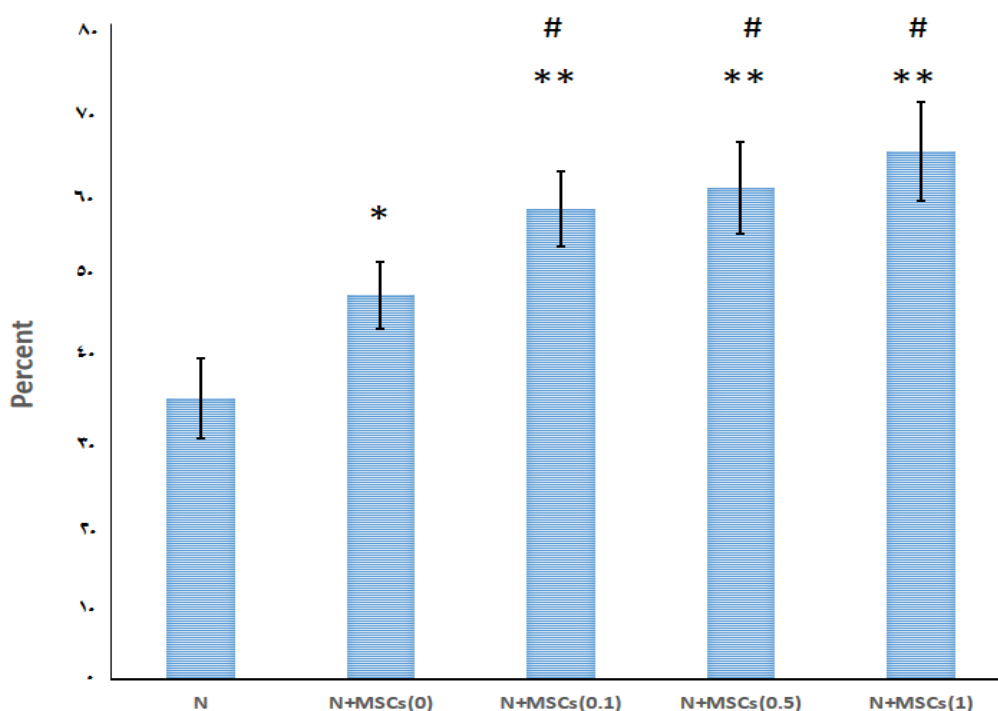
نمودار شماره ۱: ارزیابی میزان زنده مانی سلول های نوتروفیل مجاور شده با عوامل مترشح سلول های بنیادی

### مزانشیمال تیمار شده با غلظت های متفاوت نیکوتین

\*, \*\*, و \*\*\* به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  نسبت به گروه N می باشد. # و ## به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  نسبت به گروه N+MSCs(0) می باشد. & نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.001$  نسبت به گروه N+MSCs(0.1) می باشد. \$ نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.001$  نسبت به گروه N+MSCs(0.5) می باشد؛ N نوتروفیل های تنها، N+MSCs نوتروفیل های مجاور شده با عوامل مترشح سلول های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت نیکوتین بر حسب میکرومولار است.

از سلول های بنیادی مزانشیمال موجب افزایش معنی دار قابلیت فاگوسیتوز سلول های نوتروفیل شد؛ همچنین مایع رویی حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با نیکوتین در غلظت ۰/۱ میکرومتر و بیشتر به صورت غیر وابسته به دوز موجب تشدید عملکرد سلول های بنیادی مزانشیمال در افزایش قابلیت فاگوسیتوز سلول های نوتروفیل شد (نمودار شماره ۲).

فرآیند فاگوسیتوز شامل ۲ مرحله: به درون کشیدن عامل مهاجم و کشتن عامل به درون کشیده با استفاده از روش های وابسته به رادیکال های آزاد و وابسته به آنزیم های گرانیولی می باشد. تست ارزیابی فاگوسیتوز که در این مطالعه استفاده شد، ارزیابی کلی از قابلیت برداشت توسط سلول های نوتروفیل را ارائه می دهد (نمودار شماره ۲). بر همین اساس به نظر می رسد که عوامل مترشحه



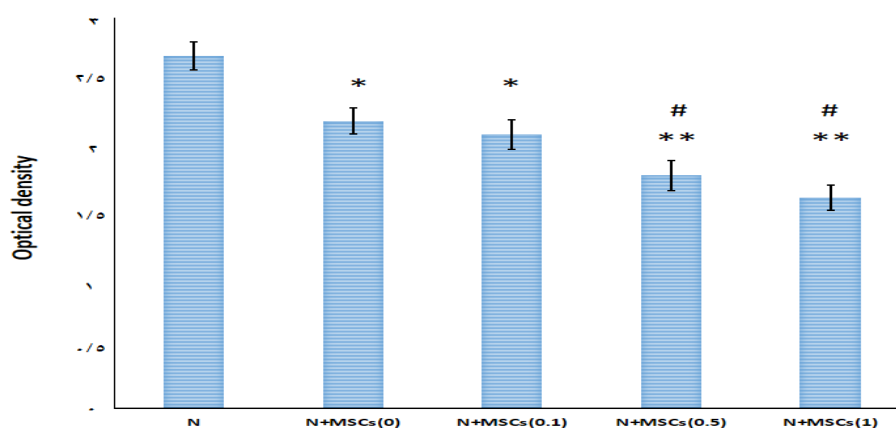
**نمودار شماره ۲: ارزیابی درصد فاگوسیتوز سلول های نوتروفیل مجاور شده با عوامل مترشحه سلول های بنیادی**

**مزانشیمال تیمار شده با غلظت های متفاوت نیکوتین**

\* و \*\* به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  نسبت به گروه N می باشد. # نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.01$  نسبت به گروه N+MSCs(0) می باشد؛ N نوتروفیل های تنها، N+MSCs نوتروفیل های مجاور شده با عوامل مترشحه سلول های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت نیکوتین بر حسب میکرومولار است.

اورئوس اپسونیزه شد (نمودار شماره ۳). تیمار نیکوتینی سلول های بنیادی مزانشیمال در حداقل در غلظت ۰/۵ میکرومتر منجر به تشدید کاهش انفجار تنفسی توسط سلول های نوتروفیل در مقایسه با مایع رویی حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار شد (نمودار شماره ۳).

آزمون احیای NBT و تست گریس به ترتیب ارزیابی کلی از قابلیت انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید توسط نوتروفیل ها را ارائه می دهد. عوامل مترشحه از سلول های مزانشیمال موجب کاهش قابل توجه میزان تولید رادیکال های آزاد اکسیژن پس از برداشت باکتری استافیلوکوکوس



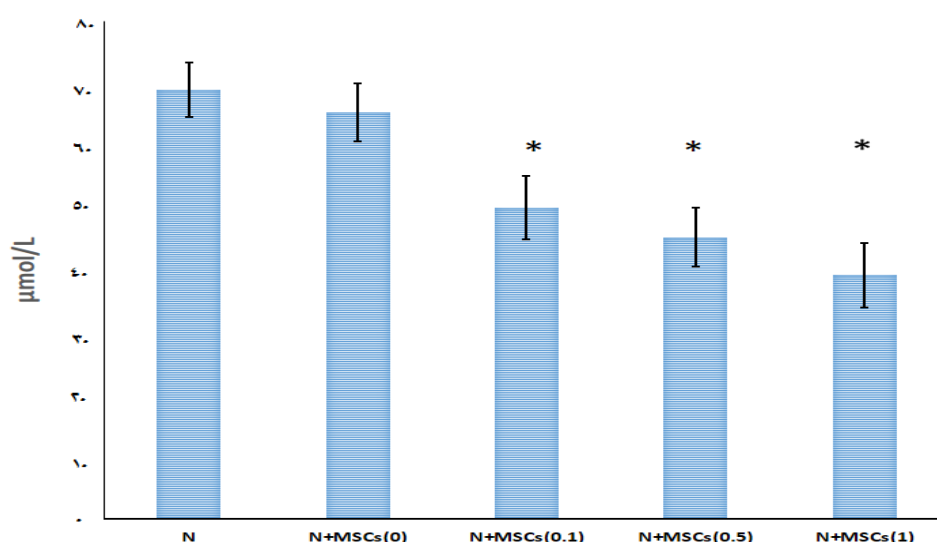
**نمودار شماره ۳:** ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی سلول های نوتروفیل مجاور شده با عوامل مترشح سلول های

بنیادی مزانشیمال تیمار شده با غلظت های متفاوت نیکوتین

\* و \*\* به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  نسبت به گروه N می باشد. # نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  نسبت به گروه N+MSCs(0) یا N+MSCs(0.1) می باشد؛ N نوتروفیل های تنها، N+MSCs نوتروفیل های مجاور شده با عوامل مترشح سلول های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت نیکوتین بر حسب میکرومولار است.

این حال تیمار نیکوتینی سلول های بنیادی مزانشیمال در حداقل در غلظت ۰/۱ میکرومتر منجر به کاهش تولید نیتریک اکساید توسط سلول های نوتروفیل شد (نمودار شماره ۳).

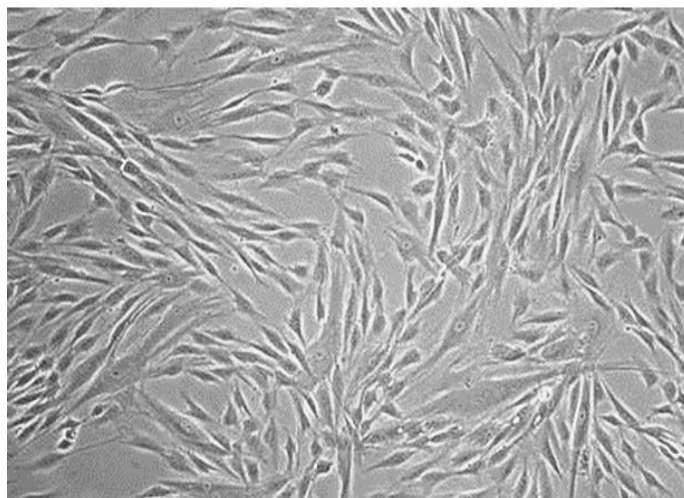
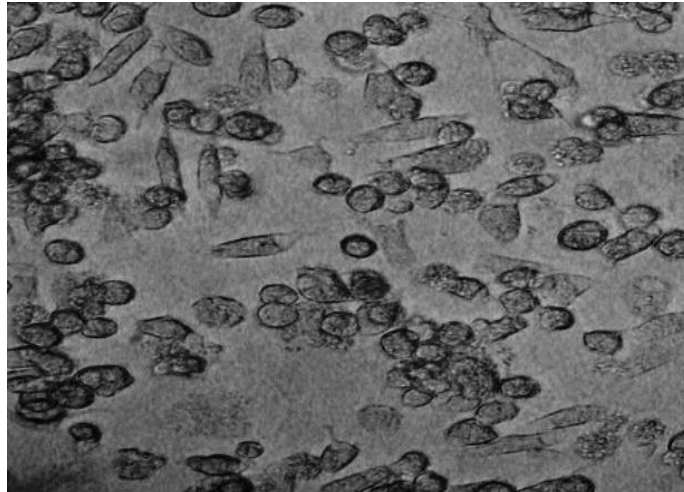
تیمار سلول های نوتروفیل با عوامل مترشحه از سلول های مزانشیمال موجب تغییر معنی داری در میزان تولید نیتریک اکساید توسط نوتروفیل ها نشد (نمودار شماره ۴).



**نمودار شماره ۴:** ارزیابی تولید نیتریک اکساید سلول های نوتروفیل مجاور شده با عوامل مترشح سلول های

بنیادی مزانشیمال تیمار شده با غلظت های متفاوت نیکوتین

\* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.01$  نسبت به گروه N می باشد؛ N نوتروفیل های تنها، N+MSCs نوتروفیل های مجاور شده با عوامل مترشح سلول های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت نیکوتین بر حسب میکرومولار است.



**تصویر شماره ۱: پاساژ سلول های آسپیره شده از مغز استخوان**

تصویر بالا سلول های آسپیره شده مغز استخوان در روز ۴، برخی از سلول ها شروع به دوکی شدن کرده اند. تصویر پایین تغییر شکل این سلول ها و دوکی شدن کامل آن ها پس از پاساژ سوم کاملاً مشهود می باشد (بزرگنمایی  $\times 40$ ).

## بحث:

موثر است (۹۸). بر اساس مطالعات پیشین به نظر می رسد که تحریک گیرنده های نیکوتینی موجود بر روی MSC ها با استفاده از نیکوتین و سایر آگونیست های گیرنده های نیکوتین از طریق زیر واحد  $\alpha_7$  گیرنده های نیکوتینی موجب افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی و همچنین القای فسفریلاسیون در برخی از پروتئین کینازهای داخل سلولی می شود (۱۱۸). افزایش کلسیم داخل سلولی در سلول های مزانشیمال بر روی فعالیت های این سلول ها از قبیل تکثیر و تمایز آن ها موثر است (۹).

مطالعات گذشته نشان داده است که عملکردهای سلول های بنیادی مزانشیمال تحت کنترل سیستم های متعدد انتقال دهنده پیام می باشد (۱۳۸،۵). به طور جالب توجهی نشان داده شده است که سلول های بنیادی گیرنده های نیکوتینی استیل کولین را از قبیل  $\alpha_3$ ،  $\alpha_5$  و  $\alpha_7$  و  $\beta_2$ ،  $\beta_4$  بروز می دهند. از طرف دیگر سلول های بنیادی مزانشیمال خود قادر به تولید استیل کولین نیز می باشند؛ بنابراین استیل کولین در شرایط فیزیولوژیک به صورت اتوکراین و یا پاراکراین بر فرایند رشد و نمو این سلول ها

برخلاف دود سیگار که به عنوان یک ترکیب کارسینوژن شناخته می شود، خود نیکوتین به عنوان یک ترکیب دارای اثرات ضد التهابی (تعدیل کننده ایمنی و محافظ بافت عصبی شناخته شده است (۱۴، ۱۵). در حقیقت مطالعات پیشین نشان داده است که نیکوتین منجر به تخفیف و بهبود بیماری هایی نظیر کولیت اولسراتیو، آلزایمر و پارکینسون شده است؛ همچنین اثرات سودمندی را در مدل تجربی اسکروز متعدد نشان داده است (۲۲-۱۶).

در ارزیابی های گذشته نشان داده شده است که سلول های بنیادی مزانشیمال از طریق تولید برخی از فاکتورهای محلول از قبیل سایتوکاین های ضد التهابی مانند (IL-6 و TGF- $\beta$ ، IL-10)، برخی متابولیت ها از قبیل (پروستاگلاندین E<sub>2</sub>) و برخی از آنزیم های مهارکننده مانند (ماتریکس متالوپروتینازها) ممکن است که بر عملکردهای سلول های ایمنی موثر باشند (۲۳). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که تیمار سلول های نوتروفیل با عوامل مترشحه از سلول های مزانشیمال موجب افزایش زنده مانی و قابلیت فاگوسیتوز این سلول ها شد. به طور همزمان عوامل مترشحه از سلول های مزانشیمال موجب کاهش سطح انفجار تنفسی نوتروفیل ها بدون تغییر در میزان تولید نیتریک در این سلول ها پس از چالش با باکتری اپسونیزه شد؛ همچنین یافته های این تحقیق نشان داد که مایع رویی سلول های بنیادی تیمار شده با نیکوتین به طور معنی داری موجب افزایش زنده مانی و قابلیت فاگوسیتوز سلول های نوتروفیل در سطحی به مراتب بیشتر از مجاورت نوتروفیل ها با مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می گردد. به علاوه مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با نیکوتین به طور معنی داری موجب کاهش انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید توسط نوتروفیل ها نسبت به مایع رویی سلول های بنیادی تیمار نشده شد. تغییر برخی از عملکردهای مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال توسط عوامل محیطی از قبیل ویتامین D<sub>3</sub> هم در گذشته نشان شده است (۲۳). بر اساس این نتایج به نظر می رسد که تیمار نیکوتینی ممکن است که موجب تشدید

اثر فاکتورهای مترشحه از سلول های بنیادی مزانشیمال به خصوص در دوزهای بیشتر را تشدید نماید. عملکرد وابسته به دوز نیکوتین بر روی سلول های بنیادی مزانشیمال در گذشته نشان داده شده است. به طور مثال نشان داده شده است که نیکوتین در غلظت ۱ میکرومولار موجب افزایش تکثیر و پیشبرد تولید نوع ۲ کلاژن در سلول های بنیادی مزانشیمال می گردد (۲۴). در همین حال نشان داده شده است که نیکوتین در غلظت ۱۰ میکرومولار موجب مهار زنده مانی و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمال می گردد. سلول های مزانشیمالی که به مدت ۴ هفته تحت تأثیر نیکوتین بوده اند، به صورت وابسته به دوز قابلیت کمتری را به سمت سلول های غضروفی از خود نشان دادند (۹).

نوتروفیل ها پس از بلوغ مغز استخوان را ترک کرده و وارد جریان خون شده و از آن طریق به بافت های ملتهب دست می یابند؛ بنابراین رابطه ی مستقیمی بین سلول های بنیادی مزانشیمال موجود در مغز استخوان و سلول های نوتروفیل ممکن است، وجود نداشته باشد. با این حال سلول های بنیادی مزانشیمال مستقر در بافت های اطراف عروقی به طور مستقیم در ارتباط با سلول های نوتروفیل بوده و انتقال این سلول ها به بافت ها را در شرایط التهابی تنظیم می کنند (۲۵، ۲۶). ذکر این نکته لازم به نظر می رسد که سلول های بنیادی مزانشیمال مستقر در بافت های اطراف عروق دارای فنوتیپ و عملکرد کاملاً مشابه با سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان می باشند (۲۶). البته به دلیل آنکه استحصال سلول های بنیادی مزانشیمال از بافت مغز استخوان به مراتب آسان تر می باشد، در مطالعات گذشته و مطالعه حاضر به منظور ارزیابی عملکرد متقابل سلول های بنیادی مزانشیمال و نوتروفیل از سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان استفاده شده است (۵، ۷). اصولاً سلول های نوتروفیل دارای نیمه عمر کوتاهی بوده و اکثر آن ها ظرف مدت کوتاهی توسط مکانیسم آپوپتوز حذف می گردند. یافته های نوین نشان داده است که سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان از طریق تولید IL-6 موجب افزایش تولید فاکتورهای ضد آپوپتوزی MCL-1



در نوتروفیل شده و همچنین به طور همزمان سطح پروتئین آپوپتیک Bax را نیز کاهش می دهد (۷). به طور مشابهی نتایج ما نیز حاکی از افزایش زنده مانی سلول های نوتروفیل پس از مجاورت با مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمال می باشد. به علاوه نتایج ما به طور مشخص نشان داد که مایع رویی سلول های بنیادی تیمار شده با نیکوتین به طور قابل توجهی در سطح بالاتری موجب بقا و زنده مانی سلول های نوتروفیل نسبت به سلول های نوتروفیل مجاور شده با سلول های مزانشیمال بدون تیمار نیکوتینی می گردد. داده های پیشین حاکی از آن است که نیکوتین موجود در دود سیگار از طریق مهار آپوپتوز سلول های نوتروفیل در پاتوژن آمفیزم ریوی و برونشیت مزمن ریوی در افراد سیگاری دخالت می کند (۲۷). در عین حال یافته های ما نیز حاکی از افزایش بقای سلول های نوتروفیل به واسطه عملکرد فاکتورهای مترشحه از سلول های بنیادی مزانشیمال بر روی نوتروفیل ها می باشد. سلول های بنیادی مزانشیمال در سایر بافت ها از قبیل ریه نیز همانند مغز استخوان و بافت های اطراف عروقی حضور دارند (۲۶)؛ بنابراین ممکن است که در کنار اثرات احتمالی نیکوتین بر روی نوتروفیل قسمتی از یافته های محققان پیشین به دلیل اثر نیکوتین بر روی عملکرد متقابل سلول های بنیادی مزانشیمال و نوتروفیل باشد. در یک مطالعه پیشین نیز نشان داده شده است که تیمار سلول های بنیادی مزانشیمال با ویتامین D<sub>3</sub> موجب افزایش قابلیت فاگوسیتوز سلول های نوتروفیل مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال شده است (۲۳، ۵).

نوتروفیل ها از طرق مختلفی ممکن است که در آسیب های بافتی مشارکت نمایند. نوتروفیل ها حاوی مدیاتورهای بالقوه آسیب رسان برای بافت ها از قبیل تعداد زیادی از پروتئازها می باشد؛ همچنین نوتروفیل ها دارای قابلیت تولید مقادیر زیادی از رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن می باشد (۲۸). سازوکارهای یاد شده به طور معمول در جهت از بین بردن پاتوژن ها عمل می کند؛ اما در صورتی که تولید این ترکیبات بالاخص رادیکال های آزاد بیش از حد یا نامناسب صورت بگیرد، در ایجاد

آسیب بافتی مشارکت می کنند. نقش فعالیت نامناسب نوتروفیل در پاتوژن بسیاری از بیماری های خود التهابی و دژنراتیو نشان داده شده است (۲۹). نتایج مطالعه ما نشان داد که فاکتورهای مترشحه از سلول های بنیادی مزانشیمال موجب کاهش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن توسط سلول های نوتروفیل می گردد؛ همچنین به طور قابل توجهی نشان داد که مایع رویی سلول های مزانشیمال تیمار شده با نیکوتین قادر به تشدید اثرات کاهش دهنده تولید رادیکال های آزاد اکسیژن توسط نوتروفیل ها در دوزهای بالاتر هستند. در مورد نیتریک اکساید نیز نشان داده شد که فاکتورهای مترشحه از سلول های بنیادی مزانشیمال تحت تیمار با نیکوتین به نحو قابل توجهی از تولید نیتریک اکساید توسط سلول های نوتروفیل می کاهد.

در کل به نظر می رسد که عوامل مترشحه از سلول های بنیادی مزانشیمال موجب ایجاد یک فنوتیپ ضد التهابی در سلول های نوتروفیل می گردد که این عملکرد در حضور دوزهایی از نیکوتین که ما در این مطالعه استفاده نمودیم. به طور قابل توجهی افزایش می یابد. البته همان طور که ذکر شد سلول های نوتروفیل مجاور شده با فاکتورهای مترشحه سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با نیکوتین قابلیت فاگوسیتوز بیشتری را نشان دادند؛ بنابراین این سلول ها به طور کارآمدی قادر به برداشت میکروارگانیسم ها و همچنین اجزا و بقایای بافتی از قبیل سلول های پیر و فرسوده می باشند که این امر به ترمیم بافتی کمک شایانی می کند. از طرفی این نوتروفیل ها میزان کمتری از رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می کنند. این مسأله یعنی کاهش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن در شرایط ایمونوپاتولوژیک از قبیل بیماری های خود ایمن در کنار افزایش پاکسازی بافتی، امر مطلوبی به شمار می آید. البته کاهش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن در شرایط بیماری های عفونی ممکن است به گسترش عفونت کمک نماید. در همین راستا افزایش میزان عفونت ها

بالاخص عفونت های ریوی در افراد سیگاری از مدت های قبل شناخته شده است (۳۰).

را در ارتباط با درک سازوکارهای ضد التهابی و ایمنومدولاتوری نیکوتین نشان دهد.

## نتیجه گیری:

یافته های ما در این مطالعه ممکن است که سازوکار جدیدی را در ارتباط با اثرات ایمنومدولاتور نیکوتین نشان دهد. بر این اساس به نظر می رسد که لااقل برخی از اثرات مفید منتسب به نیکوتین بر اثر تغییر میان کنش بین سلول های مزانشیمال و نوتروفیل صورت پذیرد. در مجموع این یافته ها ممکن است که افق جدیدی

## تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد سمیرا پورطیب در رشته ایمنی شناسی به شماره ۲۱۹-۲ و مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه (بهمن ۱۳۹۳) بوده است. منظور نویسندگان این مقاله از کارشناس محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی، جناب آقای علیاری کمال تشکر را دارند.

## منابع:

1. MacDonald V. Chemotherapy: Managing side effects and safe handling. Can Vet J. 2009; 50(6): 665-8.
2. Farmakis D, Giakoumis A, Polymeropoulos E, Aessopos A. Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with beta-thalassemia. Med Sci Monit. 2003; 9(1): RA19-22.
3. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008; 8(9): 726-36.
4. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev. 2009; 20(5-6): 419-27.
5. Galeh HEG, Delirez N, Froushani SMA, Ahangaran NA. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on neutrophil functions. Turkish J Biol. 2014; 38(3): 365-70.
6. Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death. Cell Biol Int. 2011; 35(12): 1247-51.
7. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. Stem Cells. 2008; 26(1): 151-62.
8. Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2009; 18(1): 103-12.
9. Schraufstatter IU, DiScipio RG, Khaldoyanidi SK. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells. J Stem Cells. 2009; 4(4): 203-15.
10. Chakraborty A, Gupta A, Singh AK, Patni P. Effect of Oxidative Phytochemicals on Nicotine-stressed UMNSAH/DF-1 Cell Line. J Tradit Complement Med. 2014; 4(2): 126-31.
11. Slotkin TA, Seidler FJ. Prenatal nicotine alters the developmental neurotoxicity of postnatal chlorpyrifos directed toward cholinergic systems: better, worse, or just "different?". Brain Res Bull. 2015; 110: 54-67.
12. Herning RI, Jones RT, Benowitz NL, Mines AH. How a cigarette is smoked determines blood nicotine levels. Clin Pharmacol Ther. 1983; 33(1): 84-90.
13. Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, Guo J, Huang YC, Hou WW, et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Br J Pharmacol. 2010; 161(7): 1542-52.
14. Sopor ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. J Neuroimmunol. 1998; 83(1-2): 148-56.
15. McRobbie H, Bullen C, Hartmann-Boyce J, Hajek P. Electronic cigarettes for smoking cessation and reduction. Cochrane database Sys Rev. 2014(12): CD010216.

16. Hayashi S, Hamada T, Zaidi SF, Oshiro M, Lee J, Yamamoto T, et al. Nicotine suppresses acute colitis and colonic tumorigenesis associated with chronic colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014; 307(10): G968-78.
17. Lunney PC, Leong RW. Review article: Ulcerative colitis, smoking and nicotine therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012; 36(11-12): 997-1008.
18. Lombardo S, Maskos U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*. 2015; 96(Pt B): 255-62.
19. Piao WH, Campagnolo D, Dayao C, Lukas RJ, Wu J, Shi FD. Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacol Sin*. 2009; 30(6): 715-22.
20. Shi FD, Piao WH, Kuo YP, Campagnolo DI, Vollmer TL, Lukas RJ. Nicotinic attenuation of central nervous system inflammation and autoimmunity. *J Immunol*. 2009; 182(3): 1730-9.
21. Gao Z, Nissen JC, Ji K, Tsirka SE. The experimental autoimmune encephalomyelitis disease course is modulated by nicotine and other cigarette smoke components. *PLoS One*. 2014; 9(9): e107979.
22. Naddafi F, Reza Haidari M, Azizi G, Sedaghat R, Mirshafiey A. Novel therapeutic approach by nicotine in experimental model of multiple sclerosis. *Innov Clin Neurosci*. 2013; 10(4): 20-5.
23. Motlagh BM, Ahangaran NA, Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. *Iranian J Basic Med Sci*. 2015; 18(7): 672-6.
24. Ying X, Zhang W, Cheng S, Nie P, Cheng X, Shen Y, et al. Nicotine-induced chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in vitro. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012; 20(11): 2329-36.
25. Brandau S, Jakob M, Hemeda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, et al. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol*. 2010; 88(5): 1005-15.
26. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(3): 301-13.
27. Aoshiba K, Nagai A, Yasui S, Konno K. Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis. *J Lab Clin Med*. 1996; 127(2): 186-94.
28. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 2013; 210(7): 1283-99.
29. Froushani SM, Galeh HE. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2014; 17(9): 632-7.
30. Kowada A. Cost-effectiveness of tobacco cessation support combined with tuberculosis screening among contacts who smoke. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015; 19(7): 857-63.

## Effect of secretory factors of mesenchymal stem cell pulsed with nicotine on the neutrophils functions

Pourtayeb S, Abtahi Froushani SM\*

Microbiology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

Received: 9/Nov/2015      Accepted: 8/Feb/2016

**Background and aims:** The effects of the mesenchymal stem cells (MSCs) on the neutrophil functions has been revealed in recent documents. Moreover, it has been showed that mesenchymal stem cells (MSCs) express some of the nicotinic receptor subunits. The aim of the present study was to determine the effects of the secretory factors from mesenchymal stem cell pulsed with nicotine on the neutrophil functions.

**Methods:** After isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow of rats, these cells pulsed with different concentration of nicotine (0, 0.1, 0.5 and 1  $\mu$ M) for 48h. Then, neutrophils were co-cultured with MSCs supernatants for 4 h and the functions of neutrophils were evaluated.

**Results:** The results showed that MSCs supernatants pulsed with nicotine could significantly enhance the viability and phagocytic activity of neutrophils more profound than MSCs supernatants without treatment. Furthermore, supernatants of MSCs treated with nicotine significantly reduced the respiratory burst and nitric oxide production of neutrophils more prominent than and /or supernatants of the MSCs without treatment.

**Conclusion:** Collectively, these findings may offer new insight into the potential mechanisms underlying the immunomodulatory and anti-inflammatory effects of nicotine.

**Keywords:** Mesenchymal Stem cell, Neutrophil, Nicotine.

**Cite this article as:** Pourtayeb S, Abtahi Froushani SM. Effect of secretory factors from mesenchymal stem cell pulsed with nicotine on the neutrophils functions. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(4): 94-105.

---

**\*Corresponding author:**

Microbiology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran.. Tel: 00989133000470,  
E-mail: meysamabtahi@hotmail.com